


STEP-UP PRODUCTION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR PRECURSOR

Patent Number: JP61119189
Publication date: 1986-06-06
Inventor(s): MIZUMOTO KAZUMI; others: 03
Applicant(s): GREEN CROSS CORP:THE
Requested Patent:  JP61119189
Application Number: JP19840241457 19841115
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N9/64
EC Classification:
Equivalents: JP1848442C, JP5058709B

Abstract

PURPOSE:In the production of plasminogen activator precursor, neutral aminoacids and organic acids or their salts are added to increase the production of the plasminogen activator precursor.

CONSTITUTION:As cells for producing plasminogen activator precursors, human renal cells are suitable and the cells which have been obtained after subculture of the primary culture from human renal cells. Glycine, alanine, leucine and other neutral aminoacids and organic acid such as carboxylic acids or their salts are added to effect the culture of cells which produce plasminogen activator precursor. The culture medium is exchanged and the precursor is collected from the exchanged medium by centrifugation, gel filtration and other operations.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-119189

⑨ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)6月6日

C 12 N 9/64
 // C 12 N 5/00
 (C 12 N 9/64
 C 12 R 1:91)

7421-4B
 7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 プラスミノージェンアクチベーター前駆体の産生増強方法

⑮ 特 願 昭59-241457

⑯ 出 願 昭59(1984)11月15日

⑰ 発 明 者 水 本 一 美 枚方市北中振1-24-9 ミドリ十字緑風寮
 ⑰ 発 明 者 川 上 隆 弘 尼崎市西難波町4丁目1番31号 中川方
 ⑰ 発 明 者 有 村 博 文 豊中市上野坂2丁目18番地1-401号
 ⑰ 発 明 者 森 樹 隆 神戸市垂水区坂上2丁目1番5号
 ⑰ 出 願 人 株式会社 ミドリ十字 大阪市東区今橋1丁目15番地の1
 ⑰ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

プラスミノージェンアクチベーター前駆体の産生
 増強方法

2. 特許請求の範囲

プラスミノージェンアクチベーター前駆体の産生細胞を培養して、プラスミノージェンアクチベーター前駆体を生産するに際して、培地に中性アミノ酸並びに有機酸またはその塩を含むことを特徴とするプラスミノージェンアクチベーター前駆体の産生増強方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、プラスミノージェンアクチベーター前駆体(以下、前駆体という)の産生増強方法に関する。更に詳しくは、本発明は、前駆体の産生細胞を培養して前駆体を生産するに際して、培地に中性アミノ酸及び有機酸もしくはその塩を含むことを特徴とする前駆体の産生増強方法に関する。

(従来の技術)

本発明の前駆体は、先に本発明者が見出したものであり、その詳細は特願昭58-170354号に記載されている。すなわち、本前駆体はそのままでは不活性であるが、プラスミン処理することにより酵素活性を発現する、いわゆるチモゲンの一種である。この前駆体はヒト腎細胞の無血清培地中にて生成できることが最近判明した。本前駆体はアミノ酸411個の鎖状構造を有しており、分子量5万、フィブリンに特異的な親和性を示し、従来のウロキナーゼとは全く異なる性質を有する。また、合成基質法では活性が認められず、平板法で活性を示す。その産生条件については、特願昭58-170354号で詳細に述べられているが、必ずしも、その産生効率が充分であるとは言えない。

(発明が解決しようとする問題点)

従って、本発明の目的は前駆体の産生増強方法を提供することである。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、上記目的を解決するため

に、前駆体の産生増強について検討検討した結果、前駆体産生性細胞培養培地中に、中性アミノ酸並びに有機酸またはその塩を含ませることにより、前駆体の産生を向上できることを見だし、本発明を完成した。

即ち、本発明はプラスミノゲンアクチベーター前駆体の産生細胞を培養して、プラスミノゲンアクチベーター前駆体を産生するに際して、培地に中性アミノ酸並びに有機酸またはその塩を含むことを特徴とするプラスミノゲンアクチベーター前駆体の産生増強方法に関する。

(1) 前駆体産生細胞の調製

前駆体産生細胞の原料としては、ヒト腎細胞が好適に用いられる。たとえば、ヒト腎細胞より得たprimary culture またはdiploid cells を継代培養して得られる前駆体を産生する細胞が用いられる。この種細胞を20万～30万cells/ml植え込み、培地（たとえば、Waymouth培地あるいはDulbecco's modified MEM 培地に熱不活化牛胎児血清2～5w/v%を添加したもの）を用いて2

～3日間培養を続けた後、必要ならば培地を新しく交換して継代培養し、細胞数を100万～200万cells/mlに調整する。

(2) 培養条件

基本培地としては、たとえばWaymouth培地あるいはDulbecco's modified MEM 培地に0.05～0.2w/v%ヒト血清アルブミンを添加した無血清培地が用いられる。

これに本発明の特徴である、中性アミノ酸並びに有機酸またはその塩が添加される。中性アミノ酸としてはグリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン等の脂肪族アミノ酸などが例示されるが、好適にはグリシンが用いられる。添加量としては0.1～3w/v%が例示される。添加量が、0.1%以下では産生能が十分上がらず、また、3%以上では、毒性が上がって産生能向上にはマイナスとなるためである。また、中性アミノ酸と有機酸又はその塩の割合としては、1:10～10:1（重量比）程度が望ましい。

有機酸としては炭素数3～18のものであれば

特に限定されない。通常は、カルボン酸、特に飽和または不飽和脂肪族カルボン酸（就中、モノカルボン酸またはジカルボン酸）が好適に使用される。当該有機酸は置換基として、たとえば水酸基等を有していてもよい。かかる有機酸としては、フマル酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、パルミチン酸、リノレン酸、ミリスチン酸などが例示される。特に好適には、コハク酸などの脂肪族ジカルボン酸が使用される。上記有機酸の塩としては、生理的に受け入れられる塩、たとえばアルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩など）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩など）などを用いることができる。これらの有機酸もしくはその塩の添加量としては0.1～3w/v%が例示される。

また他に添加物として公知であるラクトアルブミン水解物、トランスフェリン、インシュリン等のホルモンなどを添加してよい。

培養は、例えば前駆体産生細胞50万～200万cells/mlを一定に維持しながら、上記培地中で

行って、前駆体を産生させ、2～3日に培養培地を新しく交換する。そしてこの交換した培地中に存在する前駆体を回収する。

培地からの前駆体の回収は公知の手段を用いて行えばよく、例えば当該培地を遠心分離、減圧濃縮、塩析分画、ゲル透過、濃縮、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを、便宜組み合わせることによって行われる。

〔発明の効果〕

本発明の方法により、本前駆体の産生は従来の方法に比べて活性比で約1.3～3倍程度増強することができる。

実験例1

本発明による前駆体産生増強効果を見るために、前駆体の産生量の比較実験を行った。第1表に示したようにグリシン及びコハク酸の添加量は0～5.0w/v%の範囲で設定した。それ以外の条件は実験例1に準じて各群とも同様に行った。産生量の指標として活性を測定した。

活性量の測定は、p-MCA法により以下のよ

うに行った。即ち、検体 0.1 ml とプラスミン溶液 (0.2 cu/ml、ゼラチン緩衝液 (pH 8.6) で調整したもの) 0.1 ml を混合後、37℃ で 10 分間インキュベーションし、p-MCA 溶液 (0.1 mM Glu-Gly-Arg-MCA) 1 ml を加え、さらに 37℃ で 20 分間インキュベーションし、18 v/v% 酢酸を加えて反応を止めた後、 E_x (励起波長) 370 nm、 E_m (蛍光波長) 460 nm にて蛍光強度を測定した。その結果は、第 1 表に示す通りである。

なお単位は U/ml を用いた。U はウロキナーゼ国際単位であり、1 U/ml は検体 1 ml につきプラスミン処理によって発現する繊維素溶解活性が 1 U に相当することを意味する。

実験例 2

実験例 1 と同様にして第 2 表に記載の添加物について、併用効果を検討し、その結果を第 2 表に示した。

実施例 1

ヒト腎臓細胞より得た primary-culture を培養し、本発明前駆体を産生する細胞だけを分離後

再培養し、その 2.0×10^4 cells/ml の濃度で熱不活化ウシ胎児血清 5 w/v% 含有 Waymouth 培地に埋え込み、3 日間培養後、細胞数が 1.00×10^4 cells/ml となった時点で、さらに、0.1 w/v% ヒト血清アルブミン、0.5 w/v% グリシン、0.5 w/v% コハク酸ナトリウム含有 Waymouth 培地 (無血清培地) に上記前駆体産生細胞 1.00×10^4 cells/ml を植え直し、この濃度を維持しつつ 3 日間培養した。培養液を遠心分離し、沈殿には新しい培地を添加して培養を続けた。上清中には前駆体 (活性は 1 ml 当たり 300 U に相当) が含まれていた。

本発明により得られた前駆体は、特開昭 58-170354 で開示した「繊維素溶解酵素前駆体」と全く同一の性質を有していた。

実施例 2

実施例 1 により得られた前駆体を含む培養上清を pH 5.5 に調整した後、CM-Sephadex C-50 に接触した。0.16 M リン酸緩衝液 (pH 5.5) で吸着していた前駆体を溶出させた。

一方、前駆体で予め免疫しておいたマウス BALB/c の脾臓細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコールにより融合させたハイブリドーマのうち、前駆体に対する抗体産生の高いクローンを選択した。この融合細胞の培養液から、前駆体モノクローナル抗体を回収した。このモノクローナル抗体を CNBr 活性化 Sepharose 4B (Pharmacia 社) に固定した。

このモノクローナル抗体カラムを 0.4M NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化し、これに前記の前駆体を含有する溶出液を接触した。0.4M NaCl 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) でカラムを洗浄した後、吸着していた当該前駆体を 0.5M NaCl 含有 0.2M グリシン-HCl 水溶液 (pH 2.5) で溶出させた。溶出液を除菌濾過した後、凍結乾燥し比活性が少なくとも 80,000 U/mg の高純度前駆体を得た。

なお、この精製品は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法より分子量 5 万の 1 本の帯を示した。

第1表

	グリシン添加量						
	0	0.10	0.25	0.50	1.0	3.0	5.0
0	1.00	1.19	1.35	1.41	1.50	1.35	0.85
0.10	1.08	1.30	1.40	1.45	1.82	1.38	0.85
0.25	1.16	1.35	1.50	1.65	2.05	1.47	0.83
0.50	1.37	1.48	1.78	1.91	2.31	1.62	0.82
1.0	1.48	1.85	2.20	2.40	2.52	1.83	0.78
3.0	1.34	1.45	1.62	1.72	1.80	1.95	0.75
5.0	0.91	0.91	0.90	0.88	0.85	0.82	0.71

コハク酸添加量

表の値はグリシン、コハク酸共に無添加時の活性を100とした場合の割合を示す。
 添加量の数値は、w/v%である。

第2表

	添加物		活性比
	中性アミノ酸	有機酸あるいは塩	
無添加		無添加	1.00
グリシン	1.0	コハク酸	2.52
グリシン	0.5	フマル酸	1.86
グリシン	0.5	クエン酸	2.36
アラニン	0.5	コハク酸	2.08
アラニン	1.0	クエン酸	1.95
フェニルアラニン	1.0	フマル酸Na	2.21

(単位: w/v%)

手続補正書(自発)

6. 補正の内容

昭和60年1月26日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第241457号

2. 発明の名称

プラスミノーゲンアクチベーター前駆体の
 産生増強方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

4. 代理人 ㊟541

住所 大阪市東区平野町4丁目53番地3

ニューライフ平野町 406号

TEL (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士(8079) 高島



5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

(1) 明細書第8頁、第19行の「pH 5.5」を
 「pH 8.5」に訂正する。

(2) 同書第10、11頁、第1表と第2表の間の
 「表の値はグリシン、コハク酸共に無
 添加時の活性を100とした場合のその
 割合を示す。

添加量の数値は、w/v%である。」

を

「表の値はグリシン、コハク酸共に無
 添加時の活性を1.00とした場合のその
 割合を示す。

添加量の数値は、w/v%である。」

に訂正する。

以上